植 物 分 类 与 资 源 学 报　2013，35（6）：779～783
Plant Diversity and Resources　DOI：10.7677/ynzwyj201313197

构建基于磁珠微流控芯片的 iFlora 遗传信息高效获取系统*

马莉萍[1]，伊廷双[2]，左显维[1]，张　彪[1]，李云霞[1]，韩根亮[1]**

（1 甘肃省科学院传感技术研究所，甘肃 兰州　730000；2 中国科学院昆明植物研究所
中国西南野生生物种质资源库，云南 昆明　650201）

摘要：磁珠以其比表面积大、易与生物分子耦联、操控方便等优点，在生命科学中得到了广泛应用。随着微机电系统（Micro Electro Mechanical Systems，MEMS）技术的发展，将磁珠应用到微流控芯片中构建磁珠微流控分析系统，为生物样品分离、检测提供了一种全新方法。新一代植物志 iFlora 融入现代 DNA 测序技术，应用高速发展的信息、网络技术及云计算分析平台，收集、整合和管理植物物种相关信息，以实现物种智能鉴定和数据提取，而包括 DNA 条形码在内的遗传信息及其获取技术在 iFlora 中的作用至关重要。本文重点概述了基于纳米磁珠的微流控芯片技术及其在分子生物学领域中的应用，提出构建基于纳米磁珠微流控芯片的 iFlora 遗传信息采集系统，在微芯片上完成从 DNA 提取到测序全过程，实现物种遗传信息的快速、高效获取。

关键词：磁珠；微流控芯片；DNA 条形码；新一代植物志；遗传信息

中图分类号：TP 212.2；Q 948.2　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2013)06-779-05

A Noval Magnetic Bead-based Microchip for iFlora Genetic Information Efficient Acquisition System*

MA Li-Ping[1], YI Ting-Shuang[2], ZUO Xian-Wei[1], ZHANG Biao[1], LI Yun-Xia[1], HAN Gen-Liang[1]**

(1 *Institute of Sensor Technology*, *Gansu Academy of Sciences*, Lanzhou 730000, China; 2 *Germplasm Bank of Wild Species*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China)

Abstract: Magnetic Bead (MB) has been widely applied in life science for its high surface area, coupling capacity with biomolecules and convenience of being manipulated. With the development of Micro Electro Mechanical systems (MEMS) technologies, MB-based bio-microsystem provide a new approach for separation and detection of biological samples. Integrating modern DNA sequencing technologies and applying high-speed computer digitization, network technology and cloud computing analysis platform for collection and management of species information, the next-generation Flora, or iFlora is an intelligent application system for plant species identification and related information acquisition. Efficient genetic information acquiring technology is key in building iFlora. This paper briefly introduces the MB-based bio-microsystem technology and its application in molecular biology. The authors suggest a new MB-based bio-microsystem iFlora genetic information collection system. Combined with MB technology, the total analyses from cell lysis to DNA sequencing will be achieved on microchip, which will realize the quick and efficient acquirement of genetic information.

Key words: Gnetic bead; Microchip; DNA barcodes; iFlora; Genetic information

---

* 基金项目：中国科学院科技创新"交叉与合作团队"（31129001）；科技部国家高技术研究发展计划（863 计划）主题项目（2012AA021801）；中国科学院大科学装置项目（2009-LSFGBOWS-01）

** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：genlhan@vip.sina.com

收稿日期：2013-09-30，2013-10-16 接受发表

作者简介：马莉萍（1974-）女，副研究员，主要从事生物传感技术研究。E-mail：malip219@sina.com

新一代植物志 iFlora 的主要目的之一就是实现物种的准确、快速鉴定和相关信息的高效获取，而微型化、高效化的获取包括 DNA 条形码在内的遗传信息的装备是实现这一目的的关键所在。现有的遗传信息获取装备包括 DNA 提取系统、PCR 扩增及纯化系统、DNA 测序仪等，都存在遗传信息获取周期长、实验过程繁琐、涉及较多仪器设备、体积大等缺陷。研发集成化、自动化的便携式遗传信息高效获取装备是 iFlora 研发在未来的发展方向。

磁珠技术为弥补当前遗传信息获取设备的不足提供了全新思路。该技术是 20 世纪 90 年代生物分析学和磁珠载体技术结合而发展起来的一项新型技术（Hornes 和 Korsnes，1990；Pflueger 等，1990；Liang，1995）。磁珠（Magnetic Beads，MB）是由磁性纳米颗粒与各种含活性功能基团的材料复合而成的具有一定磁性及特殊表面结构的粒子，其可与含有相应靶物质的生物分子特异性地结合形成新的复合物，磁珠以其比表面积大、易与生物分子耦联、操控方便等优点，在生命科学中得到了广泛应用。近年来，随着微机电系统技术和生物医学工程领域的发展要求，出现了利用微流控芯片技术与磁珠检测技术相结合的芯片级磁珠操控及反应器件，着眼于构建一种高效、快速、集成化的基于磁珠的生物样品分离检测微流控芯片系统，正成为生命科学研究热点。本文在介绍磁珠微流控芯片技术的基础上，提出构建基于磁珠微芯片的 iFlora 遗传信息采集系统，实现从 DNA 提取到测序等多个技术步骤的集成和优化，获得便携式、自动化、高精度的实验装备，促进 iFlora 遗传信息的快速、高效获取。

1 遗传信息获取与 iFlora

在生物资源严重短缺、生物多样性下降、生态环境极其脆弱、生态安全形势严峻的情况下，如何实现物种快速准确识别、进而客观评价和应用生物资源，已成为世界性的新挑战。2003 年，Hebert 等（2003a，b）首次以线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I（COI）作为动物中通用的物种鉴定标记，并提出 DNA 条形码的定义，即通过使用短的标准 DNA 片段，对物种进行快速、准确的识别与鉴定，DNA 条形码技术的出现为研究物种的进化规律、遗传变异、系统发育以及生物多样性等提供了理论依据。近年来，随着分子生物学技术的迅速发展，DNA 条形码技术作为传统分类方法的有效辅助手段被广泛用于物种的鉴定（Niesters 等，1993；Brown 等，1999；Wells 等，2001；Tautz 等，2002），其在许多动物分类中得到了成功应用（Ward 等，2005；Yoo 等，2006；Havermans 等，2011；Thibaud 等，2013）。但是由于 *COI* 基因在植物中的进化速率远慢于在动物中的进化速率，因此只适用于对一些藻类进行分类研究（Saunders，2005）。为寻求一种通用的植物条形码，许多学者进行了积极的探索，但至今没有达成明确的共识。目前，寻找通用的植物条形码，实现快速准确的物种鉴定和相关数据信息的方便快捷获取，成为未来发展的必然趋势（李德铢等，2012）。

iFlora 正是在这种背景和需求下产生和发展起来的。iFlora 具有整合性、信息化、便捷性、开放性和智能化的特点（李洪涛等，2012），是使用多途径进行植物物种鉴定的智能工具。实物库、遗传信息获取系统、数字化信息库和计算分析系统的构建，以及它们之间的紧密联接是 iFlora 研制的主要内容和工作框架（曾春霞等，2012）。其中，遗传信息获取体系是实现 iFlora 智能化的关键核心之一，该体系应包括一整套的实验技术和实验装备，因此，建立遗传信息高效获取体系可极大促进 iFlora 构建的速度和效率。目前，iFlora 遗传信息的获取要经过一系列的分子生物学实验，包括样品采集、提取 DNA、利用通用引物 PCR 扩增目的片段、纯化 PCR 产物、序列测定与分析以及提交结果到相关数据库。但现有的分子生物学实验技术存在遗传信息获取时间长、依靠大量人力投入、实验繁琐、涉及较多仪器设备和空间、缺乏标准和规范的实验体系等制约因素，较大的限制了该技术领域的发展和运用（李洪涛等，2012）。因此，研发高效、自动化、小型化整合的遗传信息获取体系是发展趋势之一（Janzen 等，2005），研制集成化、微型化和智能化的 iFlora 信息采集系统是目标之一。

2 磁珠微流控芯片技术

2.1 磁珠技术原理及特点

磁珠是由磁性微粒与各种含活性功能基团的

材料复合而成的具有一定磁性及特殊表面结构的粒子，其可与含有相应配体集团的的靶物质特异性地结合，形成磁珠-靶物质的复合物，当外加磁场时，这种复合物因磁场作用而与其他组分分离，其原理见图 1。由于磁珠在磁场中具有超顺磁性的特点，当外加磁场时，磁珠可被磁化并吸附在磁极上；撤去外加磁场，磁珠的磁性消失，磁珠重新分散在溶液中。由于磁场操纵是非接触式的，即磁场不与微通道中的反应物相接触而对其进行操作，因此与电场相比，有效地避免了操纵受到反应物 pH 值、温度、表面电荷、离子浓度等因素的影响。

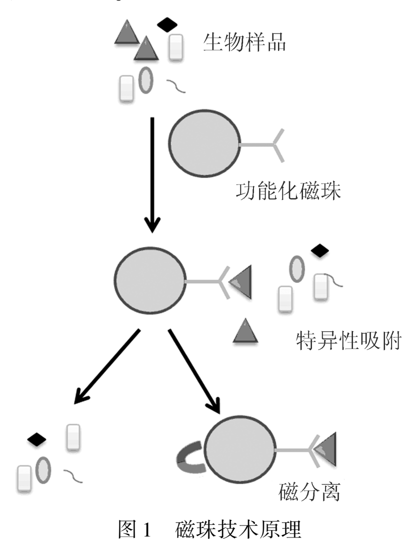


图 1　磁珠技术原理

Fig. 1　The principle of magnetic separation

目前，磁珠以其颗粒小、比表面积大、偶联容量大、悬浮稳定性好、有利于偶联反应顺利进行等优点，在细胞分离（Garlie 等，1999；Yoo 等，2013）、DNA 提取（Legler 等，2009；Zhang 等，2009；Witt 等，2012）、蛋白检测（Katharine 等，2007；Yan 等，2013）、生物检测（Min 等，2003）、酶联免疫（Zhao 和 Shippy，2004）等生物技术中表现出良好的研究和应用前景。随着应用研究的深入，磁珠技术已趋于成熟，一些厂家推出了针对生物、医学领域专用的磁珠及其配套仪器，如 Dynal，Spheorethc 等，其磁珠产品功能涵盖了 DNA 提取、蛋白分离、细菌分离、细胞捕获等方面。

2.2　基于微机电系统技术的磁珠微流控芯片

虽然常规的磁珠技术比较成熟，能有效实现磁场操控，已被广泛应用于各种生物样品检测，但也存在着一些技术缺点，如：需人为操控每个实验环节，操作步骤繁琐、费时；使用外置磁场沉降磁珠，实验平台较庞大，难以集成化、微型化，无法实现自动控制。随着微机电系统（MEMS）技术及其在生命科学中的应用发展，磁珠技术也向着微型化和集成化方向发展，首先，利用 MEMS 工艺制作微流路芯片，采用微驱动方法控制液流进行各种混合和反应，可避免生物实验中繁琐的人为操作；其次，在驱动控制方面，利用 MEMS 工艺，在芯片上制作平面线圈作为电磁控制单元，利于实现微型化，克服了常规磁珠技术存在的缺点。

这种采用 MEMS 工艺制作的微磁控单元和微流路器件构建的磁珠微系统，将样品制备、生化反应、分离和检测等基本操作单元高度集成化，整个实验过程中，磁珠无需取出或转移至其他芯片，所有步骤在一块芯片上完成，流程简单，避免了复杂的液流控制，使固液分离更加简便、灵敏，为实现系统的自动化和便携化提供了技术保障。磁珠微流控芯片采用巨磁电阻（GMR）传感器检测磁场，自旋阀型的 GMR 材料具有极高的磁场灵敏度，以自旋阀功能材料为基础的 GMR 传感器可以实现对单个磁珠的精确检测，进而实现检测单个待测生物分子的研究，所以磁珠微系统有望实现单分子级的分析水平（Edelstein 等，2000；Graham 等，2003；Li 等，2006）。

2.3　磁珠微芯片在生命科学研究中的应用

现有的微全分析系统大多都是基于光学原理检测的，其分析步骤复杂，且需要训练有素的专业人员才能进行；且光学生物芯片的检测过程依附于昂贵的生化及光学检测设备，不仅成本高，也使其应用总依赖于庞大的中心实验室。磁珠微芯片是基于磁性测量原理的第二代生物芯片，与第一代基于光学原理的生物芯片相比，以磁标记取代了传统的荧光标记，具有性价比高、价格低、更高的精确度、分辨率、稳定性、集成度、可重复使用和能够定量测量生物分子的数量等特点。近年来，磁珠微流控芯片在生命科学研究中得到了应用，从而出现了 DNA 提取芯片（Taylor 等，2005；Yeung 和 Hsing，2006）、PCR 芯片（Hua 等，2010）、测序芯片（Liu 等，1999；Xu 等，2003）等。

由于继承了毛细管电泳的特性，磁珠微流控芯片技术在DNA测序领域具有独特的应用优势。随着微流控芯片技术上的不断完善和发展，微流控分析技术能分离的DNA片段长度也在逐步扩大，出现了可同时平行分析的多通道微流控芯片，Liu等（1999）采用7.5 cm长的分离通道，在20 min内完成了对500 bp DNA的序列测定，准确度达99.4%。

3 构建基于磁珠微芯片技术的iFlora遗传信息采集系统

快速准确获取和增加植物物种遗传信息是实现iFlora的关键所在，目前尚无专门用于植物分子鉴定的系统、规范的实验技术及其实验装备体系。磁珠微流控芯片技术正好可以满足iFlora研发的需要，使遗传信息高效获取体系的集成化、便携化和自动化成为可能。根据iFlora对所获得对遗传信息的要求，研究工作应以磁珠技术为切入点，以微流控芯片技术为依托，将生物反应、磁珠技术和微流控技术相结合，研制基于磁珠微流控芯片的iFlora信息采集系统，从而实现在微流体芯片上实现DNA提取到测序等全过程，提高目前遗传信息的获取效率。研究内容包括以下几方面：

（1）制备功能化的磁珠，实现对植物基因组DNA提取，这种方法在微量材料DNA提取中独具优势。

（2）某些特异DNA片段的富集，可制备表面探针化的磁珠，如利用表面包被通用引物的磁珠直接富集目标DNA，通过这种富集得到的产物具有很高的纯度，无需经过PCR及后续的纯化过程，可直接对其进行测序。

（3）针对某些植物的DNA条码鉴定，可以制备特异的磁珠，如：直接、快速提取叶绿体细胞器，获得叶绿体总DNA，从而减轻测序工作量。

（4）针对不同碱基，研制4种不同的磁标记纳米组装体，结合磁场诱导和GMR传感器精确检测，实现芯片上的单分子测序，理论上可以实现至少对1 400 bp的单链特征DNA片段进行准确测序。

（5）根据生物反应的需求，利用MEMS工艺，设计、制作模块化的iFlore磁珠微流控系统，如DNA提取模块、PCR扩增及产物纯化模块、测序模块等，根据实际需求选择单个模块或模块间的任意组合，利用各类特异的纳米磁珠进行DNA的分离、富集、定位、和测序，实现系统的集成化和自动化。

上述工作的技术难点是如何能准确地从复杂背景信号中捕捉和测量目标信号，实现对磁标记组装体的单分子测定，这需要从事微机电技术、集成电路技术、纳米技术和生物技术的研究者共同努力，最终获得高精度、自动化和便携的iFlora遗传信息获取集成装备，摆脱目前对实验室和操作人员的过度依赖，随时随地快速、高效获取iFlora遗传信息，本技术的开发将为iFlora建设提供技术保障。

4 结语

随着生物、材料、微电子、微加工、计算机等学科的发展，微流控芯片技术得到了迅速发展，系统的集成化和微型化程度也越来越高，微流控芯片技术在生命科学研究中取得了较好的成绩。从细胞分析、蛋白质分析、再到DNA测序，已经发展到可以完成许多分子生物学实验过程的水平，其应用几乎涉及到整个生物学领域。相信在不久的将来，以微流控分析芯片为核心的检测技术将逐渐取代现行的iFlora遗传信息获取设备，实现高通量、高精度获取植物遗传信息，从而真正实现设备的小型化、自动化。

〔参 考 文 献〕

Brown B, Emberson RM, Paterson AM, 1999. Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Wiseana* (Lepidoptera, Hepialidae) species identification [J]. *Bulletin of Entomological Research*, **89** (4): 287—294

Edelstein RL, Tamanaha CR, Sheehan PE *et al*., 2000. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **14** (10): 805—813

Garlie NK, LeFever AV, Siebeulist RE *et al*., 1999. T cell coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer [J]. *Journal of Immunotherapy*, **22** (2): 336—345

Graham DL, Ferreira H, Freitas PP *et al*., 2003. High sensitivity detection of molecular recognition using magnetically labeled biomolecules and magnetoresistive sensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, **18** (4): 483—488

Havermans C, Nagy ZT, Sonet G *et al*., 2011. DNA barcoding reveals new insights into the diversity of Antarctic species of *Orchomene* sensu lato (Crustacea: Amphipoda: Lysianassoidea)

［J］. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **58** (1-2): 230—241

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003a. Biological identification through DNA barcodes ［J］. *Proceedings of the Royal Society of London*, Series A, **270** (2030): 313—321

Hebert PDN, Ratnasingham S *et al.*, 2003b. Barcoding anima life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species ［J］. *Proceedings of the Royal Society of London*, Series B, **270**: S96—S9

Hornes E, Korsnes L, 1990. Magnetic DNA hybridization properties of oligonucleotide probes attached to superparamagnetic beads and their use in the isolation of poly (A) mRNA from eukaryotic cells ［J］. *Gene Analysis Techniques*, **7** (6): 145—150

Hua ZhSh, Rouse JL, Eckhardt AE *et al.*, 2010. Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform ［J］. *Analytical Chemistry*, **82** (6): 2310—2316

Janzen DH, Hajibabaei M, Burns JM *et al.*, 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding ［J］. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, Series B, **360**: 1835—1845

Katharine ME, Alexandra HW, David GM, 2007. An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta) ［J］. *Protist*, **158** (3): 349—364

Legler TJ, Liu Z, Heermann KH *et al.*, 2009. Specific magnetic bead-based capture of free fetal DNA from maternal plasma ［J］. *Transfusion and Apheresis Science*, **40** (3): 153—157

Li DZ (李德铢), Wang YH (王雨华), Yi TS (伊廷双) *et al.*, 2012. The next-generation Flora: iFlora ［J］. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34** (6): 585—591

Li HT (李洪涛), Zeng CX (曾春霞), Gao LM (高连明) *et al.*, 2012. Genetic information and technologies related to iFlora ［J］. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34** (6): 525—531

Li GX, Sun SH, Wilson RJ *et al.*, 2006. Spin valve sensors for ultrasensitive detection of superparamagnetic nanoparticles for biological applications ［J］. *Sensors and Actuators*, A, **126** (1): 98—106

Liang BC, 1995. Use of 'long' polymerase chain reaction and magnetic beads for extraction of chromosome-specific cDNAs ［J］. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, **12** (2): 105—108

Liu SR, Shi YN, William WJ *et al.*, 1999. Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels ［J］. *Analytical Chemistry*, **71** (3): 566—573

Min SK, W JC, Su HC *et al.*, 2003. Study on bead-based micro biochip and analytical system for protein detection ［C］. The 12th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystem

Niesters HG, Goessens WH, Meis JF *et al.*, 1993. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for Candida species ［J］. *Journal of Clinical Microbiology*, **31** (4): 904—910

Pflueger E, Mueller EA, Anderer FA *et al.*, 1990. Preservation of cytotoxic function during multi-cycle immunomagnetic cell separations of human NK cells using a new type of magnetic bead ［J］. *Journal of Immunological Methods*, **129** (2): 165—173

Saunders GW, 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds selective isolation of aetinobaeillus pleuropneumoniae serotype from tonsils ［J］. *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (1): 251—254

Tautz D, Arctander P, Minelli A *et al.*, 2002. A plea for DNA taxonomy ［J］. *Trends in Ecology and Evolution*, **18** (2): 70—74

Taylor P, Manage DP, Helmle KE *et al.*, 2005. Analysis of mitochondrial DNA in microfluidic systems ［J］. *Journal of Chromatography B*, **822** (1): 78—84

Thibaud D, David P, Rodolphe R *et al.*, 2013. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology ［J］. *Applied Soil Ecology*, **65** (3): 35—42

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH *et al.*, 2005. DNA barcoding Australis's fish speces ［J］. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **360** (1462): 1847—1857

Wells JD, Pape T, Sperling FAH *et al.*, 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important sarcophagidae (Diptera) ［J］. *Journal of Forensic Sciences*, **46** (5): 1098—1102

Witt S, Neumann J, Zierdt H *et al.*, 2012. Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples ［J］. *Forensic Science International*: Genetics, **6** (5): 539—547

Xu YC, Vaidya B, Patel AB *et al.*, 2003. Solid-phase reversible immobilization in microfluidic chips for the purification of dye-labeled DNA sequencing fragments ［J］. *Analytical Chemistry*, **75** (13): 2975—2984

Yan JH, Horák D, Lenfeld J *et al.*, 2013. A tosyl-activated magnetic bead cellulose as solid support for sensitive protein detection ［J］. *Journal of Biotechnology*, **167** (3): 235—240

Yeung SW, Hsing IM, 2006. Manipulation and extraction of genomic DNA from cell lysate by functionalized magnetic particles for lab on a chip applications ［J］. *Biosensors and Bioelectronics*, **21** (7): 989—997

Yoo G, Bong JH, Park M *et al.*, 2013. Magnetic-bead-based immunoassay using *E. coli* cells with autodisplayed Z-domains ［J］. *Enzyme and Microbial Technology*, **53** (2): 118—122

Yoo HS, Eah JY, Kim JS *et al.*, 2006. DNA barcoding Korean birds ［J］. *Molecules and Cells*, **22** (3): 323—327

Zeng CHX (曾春霞), Yang JB (杨俊波), Yang J (杨静) *et al.*, 2012. A proposed pramework for iFlora ［J］. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **34** (6): 555—561

Zhang HP, Bai SH, Xu L *et al.*, 2009. Fabrication of mono-sized magnetic anion exchange beads for plasmid DNA purification ［J］. *Journal of Chromatography B*, **877** (3): 127—133

Zhao XY, Shippy SA, 2004. Competitive immunoassay for microliter protein samples with magnetic beads and near-infrared fluorescence detection ［J］. *Analytical Chemistry*, **76** (7): 1871—1876